

51

Int. Cl. 2:

C 12C 1/18

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

C 12C 1/00

DEUTSCHES PATENTAMT



DT 24 51 046 A1

11

# Offenlegungsschrift 24 51 046

21

Aktenzeichen:

P 24 51 046.1-41

22

Anmeldetag:

26. 10. 74

43

Offenlegungstag:

29. 4. 76

30

Unionspriorität:

32 33 31

54

Bezeichnung:

Enzymaktive Mischung und einstufiges Verfahren zum Aufschluß  
ungemälzter Cerealien mit Hilfe dieser Mischung

71

Anmelder:

C.H. Boehringer Sohn, 6507 Ingelheim

72

Erfinder:

Hartmeier, Winfried, Dr., 6530 Bingen; Hutt, Gerhard, Dipl.-Chem. Dr.,  
6531 Trechtingshausen

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

DT 24 51 046 A1

Case 3/156  
Dr.Ve/Ba

C. H. BOEHRINGER SOHN, INGELHEIM AM RHEIN

Enzymaktive Mischung und einstufiges Verfahren zum Aufschluß  
ungemälzter Cerealien mit Hilfe dieser Mischung

Die Erfindung betrifft eine enzymaktive Mischung zum enzymatischen Aufschluß von ungemälzter Gerste oder anderen ungemälzten Cerealien wie Weizen, Reis, Hirse, Mais, Roggen. Die enzymaktive Mischung enthält neben Malz und/oder enzymaktivem Malzextrakt einerseits noch zusätzlich mikrobielle und/oder pflanzliche Enzyme. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren, das unter Verwendung der erfindungsgemäßen enzymaktiven Mischung einen technologisch und ökonomisch günstigen Aufschluß von Cerealien-Rohfrucht bei nur einer einzigen Maischrast ermöglicht.

Die klassischen Maischverfahren zur Herstellung von Bierwürze gehen vom Rohstoff Gerstendarrmalz aus, das in einem vorgeschalteten relativ langwierigen und aufwendigen Mälzungsprozeß aus Braugerste hergestellt wird. Der teilweise Ersatz des Malzes durch billigere ungemälzte Gerste oder

sonstige ungemälzte Cerealien (Rohfrucht) ist möglich und in vielen Ländern seit langem üblich. Aufgrund noch bestehender gesetzlicher Bestimmungen ("Reinheitsgebot") ist dieser ökonomisch und technisch vorteilhafte Rohfruchteinsatz in deutschen Brauereien z.Z. noch auf Ausnahmefälle, z.B. die Herstellung von Exportbieren, beschränkt.

Der Ersatz des Malzes durch Rohfrucht beim Maischen funktioniert indessen ohne Zusatz von Enzymen nur in sehr beschränktem Umfang. Um den Rohfrucht-Schüttungsanteil vergrößern zu können, werden seit einigen Jahren Arbeitsweisen vorgeschlagen, die den Zusatz von mikrobiellen Enzymen - insbesondere  $\alpha$ -Amylase, Amyloglucosidase (= Glucamylase) und Protease - neben Malz vorsehen. Mit den neueren Verfahren gelingt es jetzt bis zu etwa 80 % Rohfrucht-Schüttungsanteil als Gersten- oder Maisrohfrucht zu verarbeiten, ohne daß die Qualität des aus dem Aufschlußprodukt gewonnenen Bieres zu stark leidet.

Die aus der Fach- und Patentliteratur bekannten Verfahren zum enzymatischen Rohfruchtaufschluß haben jedoch alle den Nachteil, relativ langwierige und komplizierte Maischverfahren zu erfordern. So arbeiten zum Beispiel relativ moderne Verfahren gemäß US-Patent 3 679 431 mit zunächst einer Maischrast bei 60 - 100°C unter  $\alpha$ -Amylase-Zusatz, dann bei 25 - 60°C unter Zusatz von  $\beta$ -Amylase bzw. Malz und Protease. Der ganze Prozeß hat eine Dauer von etwa 8 Stunden. Dieses wie auch andere bekannte Verfahren haben außerdem den Nachteil, daß die zugegebenen Enzyme und enzymaktiven Stoffe in ihrer Aktivität nicht standardisiert sind und meist zu verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Temperaturen zugesetzt werden müssen. Ohne standardisierte Enzymzubereitungen kann jedoch eine ausreichende reproduzierbare Steuerung des Verfahrens nicht erreicht werden.

In der DT-AS 2 223 656 ist ein zweistufiges Verfahren beschrieben, durch das die Maischzeit auf etwa drei Stunden verkürzt, und das Verfahren wegen der Durchführung der zwei Maischrasten bei steigenden Temperaturen wesentlich vereinfacht wird. Das Enzym wird dort als standardisiertes Gemisch zu Beginn des Maischprozesses zugegeben. Durch die Verwendung von hochdiastatischem Spezialmalz kann der Malzschüttungsanteil darin auf etwa 10 % reduziert werden, ohne daß die Qualität des aus dem Aufschlußprodukt hergestellten Bieres absinkt.

Es wurde nun gefunden, daß eine noch rationellere Arbeitsweise als die in der DT-AS 2 223 656 angegebene möglich ist, wenn neben hochdiastatischem Spezialmalz, Bakterien- $\alpha$ -Amylase, Amyloglucosidase und Papain oder Ficin auch noch Cellulase und gewünschtenfalls Bakterienproteinase und andere Enzyme als enzymatisch wirksame Substanzen eingesetzt werden und die eingesetzte Rohfrucht annähernd mehlfein vermahlen wird. Auf diese Weise wird eine weitere Verkürzung der Maischzeit sowie die Beschränkung auf eine einzige Maischrast möglich.

Weiterhin wurde gefunden, daß eine noch größere Sicherheit und Reproduzierbarkeit des Verfahrensablaufes resultiert, wenn nicht nur die zugesetzten mikrobiellen und pflanzlichen Enzyme standardisiert, sondern das Spezialmalz zusammen mit den mikrobiellen und pflanzlichen Enzymen zu einem standardisierten enzymaktiven Gemisch vereinigt wird. Auf diese Weise werden die dem Malz natürlicherweise eigenen Enzym-Aktivitätsschwankungen durch die übrigen zugesetzten Enzyme kompensiert.

Darüberhinaus wurde gefunden, daß es Vorteile bringt, das Spezialmalz, insbesondere Weizengrünmalz, unter Erhaltung seiner Enzyme zu extrahieren und den getrockneten Extrakt zu verwenden. Der Einsatz dieses enzymaktiven Malz-extraktes beim Rohfruchtaufschluß hat gegenüber der Mitverwendung von nichtextrahiertem Malz den Vorteil, zu einer schnelleren Verzuckerung zu führen und zudem Würzen mit geringerem Gerbstoffgehalt zu liefern. Auch dieser enzym-aktive Malz-Trockenextrakt wird vorteilhaft mit den übrigen mikrobiellen und pflanzlichen Enzymen vereinigt und im Hinblick auf verflüssigende, verzuckernde und proteolytische Wirkung standardisiert.

Die erfindungsgemäße enzymaktive Mischung zum Aufschluß ungemälzter Gerste und/oder anderer ungemälzter Cerealien enthält neben Malz und/oder enzymaktivem Malzextrakt die Enzyme Amyloglucosidase,  $\beta$ -Amylase, Cellulase und eine pflanzliche Protease wie Papain oder Bromelin sowie gewünschtenfalls eine oder mehrere Bakterien- oder Pilzproteasen und/oder noch weitere Enzyme (z.B. Pektinasen). Eine enzymaktive Mischung dieser Art weist etwa folgende Aktivitätswerte auf:

100 bis 350 SKB-Einheiten ( $\alpha$ -Amylase-Einheiten)  
pro Gramm,

80000 bis 250000 NF-Protease-Einheiten pro Gramm,

1500 bis 4000 Cellulase-Einheiten pro Gramm und

30 bis 100 Amyloglucosidase-Einheiten pro Gramm.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen enzymaktiven Gemisches kann beispielsweise durch Zusammenmischen von

80 bis 98 % Darrmalzmehl mit etwa 100 SKB-Einheiten  
und/oder enzymaktivem Malzextrakt mit  
etwa 200 SKB-Einheiten;

1 bis 5 % Amyloglucosidase aus Schimmelpilzen  
mit etwa 100 Amyloglucosidase-Einheiten  
pro Gramm;

0,5 bis 1,5 %  $\alpha$ -Amylase aus Bakterien mit etwa  
4000 SKB-Einheiten pro Gramm;

0,1 bis 0,3 % Pflanzenprotease (vorzugsweise Papain  
oder Ficin) mit  $50 \cdot 10^6$  NF-Protease-Ein-  
heiten pro Gramm;

0 bis 15 % Stärke als enzymfreie Trägersubstanz  
erfolgen.

Selbstverständlich hat auch ein stärker verdünntes bzw.  
stärker konzentriertes Enzymgemisch bzw. ein aus weniger  
bzw. höher aktiven Enzymen zusammengesetztes Gemisch  
die gleiche Wirkung, wenn nur das oben genannte Ver-  
hältnis der Aktivitäten pro Gramm Gemisch eingehalten wird.  
Dieses Verhältnis kann ggf. durch Abmischen unterschied-  
lich aktiver Enzymchargen bzw. Variieren der Menge der  
enzymfreien Trägersubstanz (z.B. Maisstärke, Laktose o.ä.)  
standardisiert werden. Es ist allerdings zu beachten, daß  
mindestens 50 % der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität aus Malz bzw.  
Malzextrakt stammen sollte.

Der enzymaktive Malzextrakt kann aus hochdiastatischem  
Malz, insbesondere aus Weizengrünmalz gewonnen werden.  
Dazu wird das zerkleinerte Malz mit Wasser durch ein-  
bis dreistündiges Maischen bei 50 bis 58°C extrahiert

und anschließend schonend, z.B. im Vakuumverdampfer und Vakuumtrockner, getrocknet. Der resultierende enzymaktive Malzauszug enthält den größten Teil der Malzkohlenhydrate sowie die Enzyme des Ausgangsmalzes in fast unverminderter Menge. Die  $\alpha$ -Amylaseaktivität des erfindungsgemäßen Malzextraktes liegt bei 100 bis 300 SKB-Einheiten pro Gramm. Der enzymaktive Malzextrakt wird, wie oben beschrieben, mit den übrigen Enzymen zum erfindungsgemäßen enzymaktiven Gemisch vereinigt.

Die angegebenen Enzymaktivitäten sind wie folgt definiert und bestimmt worden:

#### Amyloglucosidase-Aktivität

Eine Amyloglucosidase-Einheit entspricht der Menge Enzym, die bei pH 4,4 und 25°C in einer Minute aus löslicher Stärke so viele reduzierende Gruppen freilegt, daß diese bei jodometrischer Bestimmung einem  $\mu$ Mol entsprechen. Die Durchführung der Bestimmung erfolgt wie beschrieben von H.J. Pieper: Mikrobielle Amylasen bei der Alkoholgewinnung, S. 48-49, Verlag Ulmer, Stuttgart, 1970.

#### $\alpha$ -Amylase-Aktivität

Eine  $\alpha$ -Amylase-Einheit nach Sandstedt, Kneen und Blish (SKB-Einheit) entspricht der Menge Enzym, die bei pH 4,7 und 20°C 1 Gramm lösliche Stärke in Gegenwart eines Überschusses von  $\beta$ -Amylase soweit dextriniert, daß sich bei Färbung der Ansatzlösung mit Jod eine genormte Vergleichsfarbe ergibt. Die Durchführung der Bestimmung erfolgt nach der Vorschrift der ASBC, wie sie wiedergegeben ist in J. de Clerck: Lehrbuch der Brauerei, Bd. II, S. 597-600, Verlag VLB, Berlin, 1965.

Protease-Aktivität

Eine NF-Protease-Einheit entspricht der Menge Enzym, die unter den Reaktionsbedingungen innerhalb von einer Stunde bei pH 6,0 und 40°C aus Casein so viele trichloressigsäure-lösliche Spaltprodukte bildet, daß sie mit der Farbreaktion nach Folin und Ciocalteu gemessen einem  $\mu$  Gramm Tyrosin entsprechen. Die Durchführung der Bestimmung erfolgt wie für Papain beschrieben in: First Suppl. Food Chemical Codex, 2nd. Ed., S. 26-27, Verlag National Academy of Sciences, Washington, 1974.

Cellulase-Aktivität

Es wird eine geeignet verdünnte Lösung von Enzympräparat in 0,05 M Acetatpuffer, pH 4, hergestellt. Genau 10 ml dieser Enzymlösung werden in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben bei 40°C temperiert. Dann wird ein auf 1 x 1 cm zugeschnittenes Filterpapierstück (Fa. Schleicher & Schüll, Schwarzband Nr. 589) zugegeben und auf einer Reziprok-Schüttelmaschine geschüttelt bis das Filterpapierstück gelöst ist. Die Zeit bis zur vollständigen Auflösung wird ermittelt. Die Cellulase-Aktivität des Präparates ergibt sich darnach folgender Rechnung

$$\text{Cellulase-Einh./Gramm} = \frac{3\ 000\ 000}{\text{Zeit [min]} \cdot \text{Enzymmenge [g/Ansatz]}}$$

Die Zeit bis zur Lösung des Filterpapiers soll im Bereich von 10 bis 200 Minuten liegen, andernfalls ist die Messung mit mehr oder weniger konzentrierter Enzymlösung zu wiederholen. Die Cellulase-Aktivität muß jeweils aus fünf Einzelmessungen gemittelt werden.



Das Verfahren gemäß der Erfindung arbeitet unter Einsatz von ungemälzter Gerste und/oder anderer Rohfruchtarten als Ausgangsmaterial. Der Rohstoff wird bis auf mindestens 70 % Feinmehlanteil vermahlen und zusammen mit 5 bis 15 % des erfindungsgemäßen enzymaktiven Gemisches sowie mit 2 bis 8 Liter Wasser pro kg Rohstoff eingemaischt. Die Maische wird dann nur einer einzigen Maischrast von 1 bis 3 Stunden Dauer und einer Temperatur von 62 bis 68°C, vorzugsweise 65°C unterworfen. Das Verfahren arbeitet in einem pH-Bereich von ca. 4,8 - 6,2; vorzugsweise 5,2 - 5,8. Eine pH-Korrektur ist jedoch nicht notwendig, da sich der vorzugsweise genannte Bereich mit normalem Trinkwasser oder Brauwasser ohnehin von selbst einstellt. Die Abtrennung der Würze von den unlöslichen Treberbestandteilen erfolgt über eine geeignete Vorrichtung, wie z.B. Druckfilter, Vakuum-Drehfilter oder Separator. Sie kann in üblicher Weise, z.B. durch Eindicken oder Sprühtrocknen, konzentriert werden.

Das erfindungsgemäße Maischverfahren erspart die sowohl für den Rohfruchtaufschluß als auch für konventionelle Maischen sonst übliche Infusions- und Dekoktionstechnik mit mehreren Temperaturstufen sowie Kochen oder Dämpfen von Teilmaischen oder der Gesamtmaische. Der Maischprozeß wird somit durch die neue Arbeitsweise weit weniger arbeits-, energie- und zeitaufwendig. Außerdem bietet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Durchführung als einstufiger, kontinuierlicher Prozeß an.

Kontinuierlich kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gestaltet werden, daß einem auf 62 bis 68°C temperierten Reaktionsgefäß mit Rührwerk (Maischbottich) die Rohstoffe samt Wasser und enzymaktiver Mischung in den oben angegebenen Mengenverhältnissen laufend zugeführt werden. An anderer Stelle des Maischbottichs wird laufend Maische in gleicher Menge abgeführt wie es dem Zulauf entspricht. Die Durchfluß-

rate wird dabei so eingestellt, daß die mittlere Verweilzeit der Maische im Bottich eine bis drei Stunden beträgt. Der Ablauf gelangt dann zur Abtrennung der Treber mittels Separation oder Filtration. Infektionsprobleme ergeben sich beim kontinuierlichen Maischen wegen der hohen Arbeitstemperatur und der kurzen Verweilzeit nicht.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von enzymaktivem Malzextrakt

50 kg Weizengrünmalz mit 140 SKB-Einheiten pro Gramm Trockensubstanz und einem Trockensubstanzgehalt von 66 % wurden in 125 l Wasser eingestreut, das in einem üblichen Malzmilchapparat mit Heizmantel auf 53°C vorgewärmt war. Der Malzmilchapparat wurde dann ca. 30 Minuten bis zur restlosen Zerkleinerung des Malzes laufen gelassen. Anschließend wurde unter Umrühren 90 Minuten bei 53°C gehalten, bevor über ein Schichtenfilter filtriert wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 50°C eingedampft und getrocknet. Es resultierten 16,9 kg enzymaktiver Malzextrakt mit 5 % Restwasser und 240 SKB-Einheiten pro Gramm.

#### Beispiel 2

##### Herstellung einer enzymaktiven Mischung aus Malz und Enzymen

900 g Weizendarrmalzmehl mit 100 SKB-Einheiten pro Gramm,  
35 g Schimmelpilz-Amyloglucosidase mit 1000 Amyloglucosidase-Einheiten pro Gramm,  
8 g Bakterien- $\alpha$ -Amylase mit 4000 SKB-Einheiten pro Gramm,  
2 g Papain mit  $50 \cdot 10^6$  NF-Protease-Einheiten pro Gramm,  
werden mit Maisstärke auf 1000 g aufgefüllt und vermischt.

## Beispiel 3

Herstellung einer enzymaktiven Mischung aus enzymaktivem Malzextrakt und Enzymen

Wie Beispiel 2, jedoch anstelle von 900 g Weizendarrmalzmehl wurden 900 g enzymaktiver Malzextrakt nach Beispiel 1 eingesetzt.

## Beispiel 4

Rohfruchtaufschluß von Gerste mit enzymaktiver Mischung gemäß Beispiel 2

30 kg Braugerste wurden auf 75 %<sup>•</sup> Feinmehlanteil vermahlen und zusammen mit 3 kg der enzymaktiven Mischung gemäß Beispiel 2 in 100 l entionisiertem Wasser von 65°C eingemaischt. Diese Maische wies einen pH-Wert von 5,5 auf. Sie wurde unter Rühren 2 Stunden bei 65°C gehalten und dann über ein Druck-Plattenfilter (Seitz-Filter-schichten Sorte K 5) filtriert. Die Verzuckerung (Jodnormalität) der Maische trat nach 85 Minuten ein. Der Treberrückstand wurde mit heißem Wasser von 65°C ausgewaschen. Es resultierten 185 l Bierwürze mit 12,0 % Extraktgehalt und einem Gerbstoffgehalt von 13 mg/l.

## Beispiel 5

Rohfruchtaufschluß von Gerste mit enzymaktiver Mischung gemäß Beispiel 3

Es wurde wie in Beispiel 4 vorgegangen, jedoch mit der Abänderung, daß anstelle der enzymaktiven Mischung gemäß Beispiel 2 die enzymaktive Mischung gemäß Beispiel 3 in einer Menge von 3 kg eingesetzt wurde. Die Verzuckerung (Jodnormalität) der Maische trat nach 60 Minuten ein.

Es resultierten 185 l Bierwürze mit 12,3 % Extraktgehalt und einem Gerbstoffgehalt von 9 mg/l.

## Beispiel 6

Kontinuierlicher Rohfruchtaufschluß

30 kg Braugerste wurden auf 76 % Feinmehlanteil vermahlen und zusammen mit 3 kg enzymaktiver Mischung gemäß Beispiel 2 mit entionisiertem Wasser von 65°C und auf 130 l Volumen aufgefüllt und bei dieser Temperatur 2 Stunden lang gerührt. Dann wurden dem Maischgefäß kontinuierlich 15 kg/h Braugerste, 1,5 kg/h enzymaktive Mischung gemäß Beispiel 2 und 50 l/h Wasser kontinuierlich zugeführt über Dosierschnecken bzw. Dosierpumpen. Gleichzeitig wurde ständig so viel Maische abgezogen, daß das Arbeitsvolumen im Maischbottich bei 130 l konstant blieb. Die abgezogene Maische wurde filtriert. Es resultierte Würze, die nach Auswaschung der Filter und Einstellung auf 12,3 % Extraktgehalt die gleichen Eigenschaften aufwies wie die nach Beispiel 5 gewonnene Würze. Der kontinuierliche Maischprozeß konnte ohne Schwierigkeiten über 48 Stunden hinweg aufrechterhalten werden.

- Patentansprüche -

609818/0602

BAD ORIGINAL

Patentansprüche

- ①.) Enzymaktive Mischung zum Aufschluß ungemälzter Gerste und/oder anderer ungemälzter Cerealien, dadurch gekennzeichnet, daß sie neben Malz und/oder enzymaktivem Malzextrakt Amyloglucosidase,  $\alpha$ -Amylase, Cellulase und pflanzliche Protease sowie gewünschtenfalls noch weitere Enzyme enthält.
- 2.) Enzymaktive Mischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die pflanzliche Protease Papain, Ficin oder Bromelin ist.
- 3.) Enzymaktive Mischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als weitere Enzyme noch eine oder mehrere Bakterien- bzw. Pilzproteasen und/oder Pektinasen anwesend sind.
- 4.) Enzymaktive Mischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf Aktivitätswerte von  
100 bis 350 SKB-Einheiten pro Gramm,  
80000 bis 250000 NF-Protease-Einheiten pro Gramm,  
1500 bis 4000 Cellulase-Einheiten pro Gramm und  
30 bis 100 Amyloglucosidase-Einheiten pro Gramm  
standardisiert ist.

5.) Enzymaktive Mischung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus

80 bis 98 % Darrmalzmehl oder enzymaktivem Malzextrakt,  
1 bis 5 % Amyloglucosidase,  
0,5 bis 1,5 %  $\alpha$ -Amylase  
0,2 bis 0,7 % Cellulase,  
0,1 bis 0,3 % pflanzliche Protease und  
0 - 15 % enzymfreier Trägersubstanz

hergestellt ist.

6.) Enzymaktive Mischung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß sie enzymaktiven Malzextrakt enthält, der durch ein- bis dreistündiges Maischen bei 50 bis 58°C aus zerkleinertem Weizengrünmalz extrahiert und anschließend schonend getrocknet wurde und eine Aktivität von 100 bis 300 SKB-Einheiten pro Gramm aufweist.

7.) Verfahren zum Aufschluß ungemälzter Cerealien, dadurch gekennzeichnet, daß der auf einen Feinmehlanteil von mindestens 70 % vermahlene Rohstoff zusammen mit 5 bis 15 % einer enzymaktiven Mischung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 eine bis drei Stunden lang bei einer Temperatur zwischen 62 und 68°C und einem pH zwischen 4,8 und 6,2 gemaischt wird.

8.) Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß in dem sich mit normalem Trinkwasser von selbst einstellenden pH-Bereich gearbeitet wird.

9.) Verfahren zum Aufschluß ungemälzter Gerste und/oder anderer ungemälzter Cerealien nach Anspruch 7 und/oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Maischprozeß kontinuierlich einstufig durchgeführt wird.

609818/0602